

10/019954

INPI
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLEPCT/FR 00/681872
10/019954 #2

REC'D 16 AUG 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

FR00/1972

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

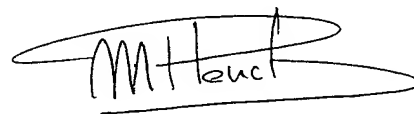
COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **7 JUIL 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9908772**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **07 JUIL. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

237668 D18031 PM

01 45 00 92 02

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de production d'oligosaccharides.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

Forme juridique

ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET TECHNO...

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

3, rue Michel Ange, 75016 PARIS

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92-1001

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

X

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 08772

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé de production d'oligosaccharides.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

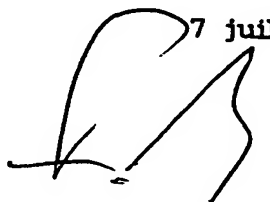
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel Ange, 75016 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

SAMAIN Eric
5, Allée du Charmant Som
38160 GIERES, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

7 juillet 1999


CABINET REGIMBEAU

92-1001

La présente invention a pour objet la production par voie microbiologique d'oligosaccharides d'intérêt biologique.

Il est maintenant bien établi que les oligosaccharides jouent un rôle biologique important notamment au niveau de l'activité et de la fonction des protéines ; ils servent ainsi à moduler la durée de la demi-vie des protéines, parfois ils interviennent dans la structure de la protéine. Les oligosaccharides jouent un rôle critique dans la variabilité antigénique (groupe sanguin par exemple), et dans certaines infections bactériennes telles celles provoquées par *Neisseria meningitidis*.

Comme les oligosaccharides sont habituellement obtenus avec un faible rendement par purification à partir de sources naturelles, la synthèse d'oligosaccharides est devenue un challenge majeur de la chimie des carbohydrates, afin de fournir des quantités suffisantes d'oligosaccharides bien caractérisés, nécessaires à la recherche fondamentale ou pour toutes autres applications potentielles (Boons *et al.*, 1996).

La synthèse d'oligosaccharides complexes d'intérêt biologique peut être réalisée par voie chimique, enzymatique ou microbiologique.

Malgré le développement de nouvelles méthodes chimiques de synthèse d'oligosaccharides au cours de ces 20 dernières années, la synthèse chimique d'oligosaccharides reste très difficile en raison des nombreuses étapes de protections et de déprotections sélectives, de la labilité des liaisons glycosidiques, des difficultés à obtenir des couplages régiospécifiques et des faibles rendements de production. Comme le nombre des étapes augmente avec la taille de l'oligosaccharide, la préparation de larges quantités d'oligosaccharides plus longs que les trisaccharides n'est pas aisée. Contrairement à l'expérience de la synthèse peptidique ou de la synthèse nucléique, la chimie organique synthétique traditionnelle ne peut donc fournir aujourd'hui une synthèse de qualité et en quantité d'oligosaccharides même de formule simple.

Conséquemment, les méthodes enzymatiques sont devenues plus populaires car elles permettent une synthèse régiosélective dans des conditions douces et sans étape de protection des groupes hydroxyles. Le développement de l'approche enzymatique a été rendu possible par le
5 clonage et l'identification fonctionnelle de nombreux gènes codant pour les enzymes intervenant dans la voie de synthèse des oligosaccharides. Ainsi, différents types d'enzymes peuvent être utilisés pour la synthèse *in vitro* d'oligosaccharides. La fonction physiologique des glycosyl-hydrosylases et des glycosyl-phosphorylases est de dépolymériser les
10 oligosaccharides mais elles peuvent également être utilisées *in vitro* dans la synthèse des oligosaccharides en contrôlant l'équilibre et la cinétique de la réaction. Les substrats des enzymes de ces réactions sont aisément disponibles mais ces réactions enzymatiques ne sont pas très versatiles. Une autre méthode enzymatique développée utilise les
15 glycosyl-transférases de la voie biochimique Leloir qui présentent une forte régiospécificité pour le précurseur ainsi que pour le substrat donneur ; ces glycosyl-transférases ne sont pas aussi aisément disponibles que les glycosyl-hydrolases. La technique de l'ADN recombinant, à récemment permis de cloner et de produire un certain
20 nombre d'entre elles. Cependant, la principale limitation de cette méthode enzymatique réside dans le coût très élevé des nucléotides-sucres qui sont les donneurs de sucre utilisé par ces enzymes.

La voie microbiologique de production d'oligosaccharides recombinants *in vivo* est la plus séduisante des voies de synthèse
25 puisque la bactérie se charge à la fois de la biosynthèse des enzymes, de la régénération des nucléotides-sucres et finalement de la production de l'oligosaccharide.

Les premières descriptions de la synthèse d'oligosaccharides par la voie microbiologique utilisant des bactéries recombinantes peuvent
30 être considérées dans une certaine mesure comme les travaux qui ont conduit à l'élucidation des voies de biosynthèse des facteurs de

nodulation ; ces facteurs sont des molécules signal secrétées par les rhizobia pour permettre la reconnaissance par les légumineuses dans le processus de nodulation. Les facteurs de nodulation sont constitués d'un squelette chitooligosaccharidique portant différentes substitutions.

5 L'identification fonctionnelle des gènes *nod* impliqués dans la biosynthèse des facteurs de nodulation a été en partie réalisée en identifiant les oligosaccharides formés *in vivo* dans des souches d'*Escherichia coli* exprimant ces différents gènes *nod* (Gérémia *et al*, 1994 ; Kamst *et al*, 1995 ; Spaink *et al*, 1994 ; Mergaert *et al*, 1995).
10 Cependant, la production d'oligosaccharides en elle-même n'était pas le but de ces études ; ces produits n'ont été synthétisés qu'à l'état de trace et ne furent identifiés que grâce à l'utilisation de précurseurs radioactifs.

En revanche, il a été récemment démontré dans notre laboratoire
15 (Samain *et al*, 1997) que la culture à haute densité cellulaire de souches d'*Escherichia coli* possédant le gène *nodC* (chitooligosaccharide synthase) permettait de produire des quantités importantes supérieures à 2 g/l de chitooligosaccharides dits recombinants.

Cette technique de synthèse microbiologique d'oligosaccharides
20 reste cependant limitée à la production des seuls chitooligosaccharides, du fait de la propriété unique de *nodC* (chitooligosaccharide synthase) de fonctionner sans précurseur, les autres enzymes glycosylent en effet un précurseur spécifique et leur activité est donc dépendante de la présence de ce précurseur dans la cellule. Le problème du précurseur
25 est donc le principal verrou qui bloque le développement de la méthode et de son extension à la production d'autres types d'oligosaccharides.

La présente invention a donc pour objet un procédé de production d'un oligosaccharide d'intérêt par une cellule à partir d'au moins un précurseur exogène internalisé par ladite cellule, ledit précurseur
30 intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit procédé comprenant les étapes (i) d'obtention d'une cellule

qui comprend au moins un gène codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification dudit précurseur exogène ou de l'un des intermédiaires de la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur exogène nécessaire à la synthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ladite cellule étant dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit oligosaccharide, ledit précurseur et lesdits intermédiaires ; (ii) de mise en culture de ladite cellule en présence d'au moins un dit précurseur exogène, dans des conditions permettant l'internalisation dudit précurseur exogène par ladite cellule et la production dudit oligosaccharide par ladite cellule.

Selon un mode particulier de réalisation, la présente invention concerne un procédé tel que décrit ci-dessus caractérisé en ce que ladite cellule comprend en outre au moins un gène codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification d'un précurseur endogène intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit enzyme étant identique ou différent de l'enzyme utilisé dans le procédé décrit ci-dessus, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule et caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur.

On entend désigner par oligosaccharides, des polymères linéaires ou ramifiés au nombre variable de résidus, de liaisons et de sous-unités ; le nombre de résidus étant supérieur à 1. Les oligosaccharides sont des glucides qui se transforment à l'hydrolyse en plusieurs molécules de monosaccharides ; les monosaccharides étant les sucres qu'on ne peut transformer par hydrolyse en substance plus simple. On subdivise les monosaccharides en trioses, tétroses, pentoses, hexoses, heptoses selon le nombre d'atomes de carbone de leur chaîne hydrocarbonée et aussi en aldoses et cétooses selon la présence d'une

fonction aldéhydrique ou d'une fonction cétone dans leur molécule. Parmi les monosaccharides les plus fréquents, on peut citer le mannose, le glucose, le galactose, le N-acétyl-glucosamine, le N-acétyl-galactosamine. Le nombre de chaînes d'oligosaccharides stéréoisomères
5 est extrêmement large, du au nombre important de carbones asymétriques dans la chaîne hydro-carbonée.

Par précurseur exogène, on entend désigner un composé intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide selon l'invention qui est internalisé par ladite cellule. Par précurseur
10 endogène, on entend désigner un composé intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide selon l'invention qui est naturellement présent dans ladite cellule.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule choisie parmi les bactéries et les levures. Selon un mode
15 de réalisation préférée de l'invention, la bactérie est choisie parmi le groupe composé de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tuméfaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Thermophilus aquaticus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*. Selon un
20 mode préféré de réalisation de l'invention, la bactérie est *Escherichia coli*. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule est une levure qui est de préférence *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*. La cellule selon l'invention est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit oligosaccharide,
25 ledit précurseur ou lesdits intermédiaires métaboliques.

La séquence d'acide nucléique codant pour l'enzyme selon l'invention est soit naturellement présente dans ladite cellule soit est introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant
connues de l'homme du métier. Dans la présente description, on
30 entendra désigner par acide nucléique, un fragment d'ADN, aussi bien double brin que simple brin, que des produits de transcription desdits

ADNs, et/ou un fragment d'ARN. Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant et qui code pour un enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide d'intérêt est
5 hétérologue. On entend désigner par séquence d'acide nucléique hétérologue, une séquence d'acide nucléique qui n'est pas présente naturellement dans la cellule selon l'invention. La séquence d'acide nucléique hétérologue selon l'invention peut provenir de tout type cellulaire animal ou végétal, eucaryote ou procaryote et peut provenir de
10 virus.

Parmi les cellules procaryotes à partir desquelles provient la séquence d'acide nucléique hétérologue, il convient de citer les bactéries et notamment *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*,
15 *Thermophilus aquaticus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*.

Parmi les cellules eucaryotes unicellulaires à partir desquelles provient la séquence d'acide nucléique hétérologue il convient de citer
20 les levures et notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*.

Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique hétérologue provient de cellules eucaryotes végétales ou animales. Selon un mode encore préféré, la séquence d'acide nucléique
25 hétérologue provient de cellules de mammifères et de préférence de cellules humaines.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule selon l'invention est la bactérie *Escherichia coli* et la séquence d'acide nucléique introduite dans la bactérie et codant pour l'enzyme selon
30 l'invention provient de préférence de bactérie choisie dans le groupe cité ci-dessus.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour l'enzyme selon l'invention est introduite dans ladite cellule sous la forme d'un vecteur d'expression. Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Le vecteur doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule au cours des générations successives et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de l'enzyme traduite. Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acides nucléiques peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou dans des vecteurs intégratifs qui s'intègre dans le génome de l'hôte choisi. De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte cellulaire approprié par des méthodes standard, telles par exemples le choc thermique ou l'électroporation.

L'invention vise en outre les cellules ci-dessus caractérisées en ce qu'elles sont transformées par au moins un acide nucléique isolé recombinant codant pour l'enzyme selon l'invention ou par au moins un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ladite modification effectuée par ladite enzyme est choisie parmi la glycosylation, la sulfatation, l'acétylation, la phosphorylation, la succinylation, la méthylation et l'addition d'un groupe énoypyruvate. Plus particulièrement, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ledit enzyme est un enzyme capable d'effectuer une glycosylation choisi parmi les glycosyl-transférases, les glycosyl-hydrolases, les glycosyl-phosphorylases. Selon un mode préféré de réalisation, l'enzyme capable d'effectuer la glycosylation est une glycosyl-transférase. Selon un mode de réalisation préféré, la glycosyl-transférase selon l'invention

est choisie parmi la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, la β -1,4-galactosyl-transférase, l' α -1-3-galactosyl-transférase, l' α -1,4-galactosyl-transférase, l' α -2,3-sialyl-transférase, l' α -1,3-fucosyl-transférase. Les glycosyl-transférases utilisées dans la présente invention sont capables de la conjugaison stéréospécifique d'unité de saccharides spécifiques
5 activés sur une molécule acceptrice spécifique. Les saccharides activés consistent en général en des dérivés de saccharides uridine-, guanosine- et cytidine-diphosphate. Ainsi, les saccharides activés peuvent être un UDP-saccharide, un GDP-saccharide, un CMP-saccharide.
10

Certains gènes codant pour des glycosyl-transférases utilisées dans le procédé selon l'invention ont été décrits au préalable ; ainsi la demande internationale de brevet WO 96 10086 décrit la synthèse classique d'oligosaccharide : au cours d'une première étape, les
15 différentes glycosyl-transférases sont produites dans des bactéries recombinantes possédant les gènes *lgtA*, *lgtB* et *lgtC* de *Neisseria gonorrhoeae*, puis après purification des enzymes recombinantes ainsi produites, les oligosaccharides sont synthétisés *in vitro* en présence des précurseurs et des nucléotides-sucres nécessaires.

20 Selon certains modes de réalisation de l'invention, l'enzyme capable d'effectuer une acétylation est codé par le gène NodL de la bactérie *Azorhizobium caulinodans*. Selon un autre mode de réalisation, l'enzyme capable d'effectuer une sulfatation est codé par le gène NodH de la bactérie *Rhizobium meliloti*.

25 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ladite mise en culture cellulaire est effectuée de préférence sur un substrat carboné ; selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ledit substrat carboné est choisi parmi le glycérol et le glucose. D'autres substrats carbonés peuvent également être employés ; il convient de
30 citer le maltose, l'amidon, la cellulose, la pectine, la chitine. Selon un

autre mode de réalisation, la culture cellulaire est réalisée sur un substrat composé d'acides aminés et/ou de protéine et/ou de lipides.

Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ladite étape de mise en culture est effectuée dans des conditions permettant l'obtention d'une culture à haute densité cellulaire ; cette étape de mise en culture comprend une première phase de croissance cellulaire exponentielle assurée par ledit substrat carboné, une seconde phase de croissance cellulaire limitée par ledit substrat carboné qui est ajouté de manière continue et enfin une troisième phase de croissance cellulaire ralentie obtenue en ajoutant de manière continue dans la culture une quantité dudit substrat diminuée par rapport à la quantité de substrat ajoutée à l'étape b) de façon à augmenter la teneur en oligosaccharides produits dans la culture à haute densité cellulaire.

Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la quantité de substrat ajouté de manière continue dans la culture cellulaire au cours de ladite phase c) est diminuée d'au moins 30%, de préférence 50%, de manière préférée 60% par rapport à la quantité de substrat ajouté de manière continue lors de ladite phase b). Le procédé selon l'invention se caractérise également en ce que ledit précurseur exogène est ajouté lors de la phase b).

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé se caractérise en ce que ledit précurseur exogène est de nature glucidique, de préférence de nature oligosaccharidique.

L'originalité et la faisabilité du procédé selon l'invention repose sur l'utilisation de deux modes d'internalisation du précurseur exogène qui ne détruisent l'intégrité de la cellule ni n'atteignent ses fonctions vitales. Ceci exclut notamment les techniques classiques de perméabilisation de la membrane par des solvants organiques qui vont bloquer la croissance et le métabolisme énergétique. Les deux modes possibles d'internalisation du précurseur exogène utilisent un mécanisme de transport passif ou actif.

L'invention concerne tout d'abord un procédé caractérisé en ce que ledit du précurseur exogène est internalisé selon un mécanisme de transport passif. On entend désigner par internalisation par transport passif, la diffusion passive d'un du précurseur exogène à travers la membrane plasmique, le flux moléculaire s'orientant des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées pour tendre finalement vers un état d'équilibre. L'internalisation par transport passif consiste à utiliser un précurseur exogène qui est suffisamment petit et hydrophobe pour diffuser passivement au travers de la membrane. Un précurseur, monosaccharidique ayant la position anomérique bloquée par un substituant alkyl constitue un exemple de précurseur susceptible d'être internalisé de cette manière. La présente invention concerne donc un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur exogène est un monosaccharide dont le carbone anomère est lié à un groupement alkyl ; de préférence ledit groupement alkyl est un groupement allyl. C'est donc un des objets de l'invention de fournir un procédé de production d'oligosaccharides qui possèdent un groupement fonctionnalisable comme le groupement allyl et qui sont utilisables de ce fait comme précurseur pour la synthèse chimique de glycoconjugués (néoglycoprotéine ou néoglycolipides) ou de glycopolymères. En effet, la double liaison du groupement allyl est susceptible d'être ouverte par ozonolyse pour former un aldéhyde et permettre la conjugaison de l'oligosaccharide sur une protéine par amination réductive (Roy et al., 1997). Une autre voie est l'addition de cystéamine (Lee et Lee, 1974, Roy et al., 1997) sur la double liaison de l'allyl pour former un groupement amine terminal qui peut par exemple réagir avec les groupements carboxyliques des protéines. Selon un mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention concerne la production du $[\beta\text{-D-Gal-[1}\rightarrow\text{4]}\text{-}\beta\text{-D-GlcNac-1}\rightarrow\text{O-allyl}]$; le procédé se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype LacZ⁻, ledit enzyme est la $\beta\text{-1,4-galactosyl-transférase}$, ledit substrat est le glycérol et ledit précurseur

est l'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl). Enfin, selon un autre mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la double liaison du groupement allyl dudit (β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl) est modifiée chimiquement par des réactions d'addition, d'oxydation ou d'ozonolyse.

La présente invention concerne également un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur est internalisé selon un mécanisme de transport actif. On entend désigner par internalisation par transport actif, l'aptitude des cellules et de manière préférée les bactéries à admettre et concentrer sélectivement certaines substances ou précurseurs exogènes dans leur cytoplasme. Ce transport est réalisé par des transporteurs de nature protéique appelés perméases qui agissent comme des enzymes ; les perméases sont des catalyseurs inductibles, c'est-à-dire synthétisés en présence de substrat ou du précurseur.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le lactose et les β -galactosides constituent des précurseurs qui sont transportés activement dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* par la lactose perméase encore appelée galactoside perméase. L'invention concerne donc un procédé selon l'invention caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose perméase. Le lactose perméase possède une spécificité assez large qui lui permet de transporter, outre le lactose, d'autres molécules. Elle est en effet capable de transporter divers β -galactosides naturels ou synthétiques, des α -galactosides et le saccharose. C'est donc l'un des objets de l'invention de fournir, selon un mode préféré de réalisation, un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur est le lactose qui constitue le motif de base de très nombreux oligosaccharides biologiquement actifs. Il est également dans l'étendue de l'invention de fournir un procédé caractérisé en ce que en ce que ledit précurseur est choisi dans le groupe composé de : (i) β -galactosides naturels ou synthétiques, de préférence dans le 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose

(lactulose), le 3-O- β -D-galactopyranosyl-D-arabinose et l'allyl- β -D-galactopyranoside, (ii) d' α -galactosides, de préférence le mélibiose et le raffinose, (iii) de saccharose.

La spécificité de la lactose perméase peut même être modifiée par mutation et permettre le transport d'autres composés tels le maltose et le cellobiose. Tous ces composés peuvent donc être utilisés comme précurseur pour la synthèse d'oligosaccharides. Il est également dans l'étendue de cette invention d'utiliser comme précurseurs des analogues du lactose possédant un groupement chimiquement réactif pour une fonctionnalisation ultérieure du produit de préférence un de ces analogues est l'allyl β -D-galactopyranoside. Il est également dans l'étendue de cette invention d'utiliser d'autres perméases modifiées ou non par les techniques de l'ADN recombinant pour permettre l'internalisation de différents types de précurseurs.

Les β -galactosides sont normalement hydrolysés dans le cytoplasme de la bactérie par la β -galactosidase codée par le gène LacZ. Afin de s'affranchir de ce problème, un mutant bactérien *lacZ*⁻ dépourvu d'activité β -galactosidase est utilisé lorsque le précurseur employé est le lactose et/ou un β -galactoside. C'est donc également un des objets de l'invention de fournir le procédé selon l'invention caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur ainsi que lesdits intermédiaires métaboliques. Selon un mode préféré de réalisation, le procédé se caractérise en ce que ladite cellule a un génotype LacZ⁻.

Selon un autre aspect de l'invention, le procédé se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'addition d'un inducteur dans ledit milieu de culture pour induire l'expression dans ladite cellule dudit enzyme et/ou d'une protéine impliquée dans ledit transport actif; selon un mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ladite protéine est la lactose perméase.

L'invention permet pour la première fois de produire des oligosaccharides complexes avec des rendements de l'ordre du gramme par litre. Selon sa taille, l'oligosaccharide soit s'accumule dans le cytoplasme bactérien, soit est sécrété dans le milieu de culture. Ainsi, selon un mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype LacZ⁻, LacY⁺, ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, ledit substrat est le glycérol, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ledit précurseur est le lactose.

Selon un deuxième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine; il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype LacZ⁻, LacY⁺, lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glucose, ledit inducteur est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), ledit précurseur est le lactose.

Selon un troisième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype LacZ⁻, LacY⁺, ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, ledit substrat est le glycérol, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

Selon un quatrième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production d'analogues du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamines dans lesquels le résidu glucose est

remplacé par un groupement allyl ; il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$, lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glucose, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

Selon un cinquième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour production de l'allyl- β -D-lactosamine (β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNac-1->O-allyl); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$, ledit enzyme est la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glycérol, ledit précurseur est l'allyl-N-acétyl β -D-glucosaminide (β -D-GlcNac-[1->O-allyl]).

L'invention concerne également un procédé qui permet d'envisager la production d'un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par glycosylation du lactose. En effet, outre les gènes *lgtA* et *lgtB* qui code respectivement pour la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase, plusieurs gènes de glycosyl-transférases bactériennes utilisant le lactose comme précurseur ont été récemment clonés. Il s'agit de *lgtC* (β -1,4-galactosyl-transférase) et de *Lst* (α -2,3 sialyl-transférase) (Gilbert *et al.*, 1997). L'utilisation de ces gènes dans un procédé selon l'invention permet de produire des molécules comme le globotriose (P^k blood antigen) et le sialyl-lactose. Par ailleurs, la coexpression des gènes *LgtA* et *LgtB* avec le gène de la α -1,3 fucosyl-transférase de *Helicobacter pylori* (Martin *et al.*, 1997) selon un procédé selon l'invention permet l'obtention du Lewis^x pentasaccharide. L'addition du gène *Lst* (α -2,3 sialyl-transférase) donne accès au sialyl Lewis^x hexasaccharide.

Le procédé selon l'invention permet également d'obtenir un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par glycosylation de

précurseurs exogènes autre que le lactose et transportés par la lactose perméase ou par d'autres perméases.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par modification (sulfatation, acétylation, phosphorylation, succinylation, méthylation, addition d'un groupement énoypyruvate) *in vivo* de précurseurs. La synthèse de certains oligosaccharides peut nécessiter outre la modification de précurseurs exogènes, la modification de précurseurs endogènes. Ainsi, il est envisageable d'introduire dans une bactérie *Escherichia coli* K12 le gène d'enzyme impliqué dans le métabolisme de précurseur endogène pour permettre la production de certains nucléotides-sucres tels que par exemple le CMP-acide sialique, l'UDP-GalNAc ou le GDP-fucose qui ne sont pas normalement produit par cette souche bactérienne, afin de réaliser la synthèse d'un oligosaccharide d'intérêt. Par exemple, l'UDP-GalNAc peut être produit à partir de l'UDP-GlcNAc si le gène de l'épimérase est introduit dans une cellule selon l'invention.

Contrairement à la méthode enzymatique de synthèse *in vitro* d'oligosaccharides qui nécessite l'utilisation de molécules très onéreuses comme l'ATP, l'acétyl-CoA, le PAPS (adénosine 3' phosphate-5'phosphosulfate), ou le phospho-énoypyruvate l'un des intérêts de la présente invention réside dans le fait que ces molécules sont naturellement recyclées dans la cellule permettant ainsi d'abaisser les coûts de production des oligosaccharides.

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé pour produire des oligosaccharides marqués ou enrichis avec des radioisotopes; de tels oligosaccharides sont extrêmement précieux pour les études fondamentales de biologie ou d'analyse conformationnelle. L'invention concerne donc un procédé de production d'oligosaccharide marqué par au moins un radioisotope caractérisé en ce que ladite cellule est cultivée sur ledit substrat carboné marqué par ledit radioisotope et/ou en présence d'undit précurseur marqué par ledit

radioisotope. Les radioisotopes sont choisis de préférence dans le groupe composé de : ^{14}C , ^{13}C , ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P .

L'invention concerne aussi un oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

5 Selon un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un oligosaccharide activé utilisable pour la synthèse chimique de glycoconjugués ou de glycopolymères susceptible d'être obtenu par un procédé tel que décrit précédemment, ledit oligosaccharide étant
10 chimiquement par des réactions d'addition, d'oxydation, ou d'ozonolyse.

L'oligosaccharide selon l'invention est utile dans une large gamme d'applications thérapeutiques et diagnostiques ; il peut par exemple être utilisé comme agent bloquant de récepteurs de surface cellulaire dans le traitement de multiples maladies faisant intervenir l'adhésion cellulaire
15 ou être utilisé comme suppléments nutritionnels, antibactériens, agents anti-métastatiques, agents anti-inflammatoires. L'invention concerne donc un oligosaccharide selon l'invention à titre de médicament et notamment à titre de médicament destiné à empêcher sélectivement l'adhésion de molécules biologiques. L'oligosaccharide selon l'invention
20 est également utilisé à titre de médicament destiné au traitement du cancer, de l'inflammation, des maladies cardiaques, du diabète, des infections bactériennes, des infections virales, des maladies neurologiques et à titre de médicament destinés aux greffes. L'invention porte également sur une composition pharmaceutique caractérisée en
25 ce qu'elle comprend un oligosaccharide selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Enfin, l'invention concerne aussi l'utilisation d'un oligosaccharide selon l'invention dans l'agriculture et l'agronomie notamment pour la croissance et la défense des végétaux. En effet, les oligosaccharides
30 jouent un rôle prédominant dans la symbiose Rhizobium/légumineuse. En effet, certains oligosaccharides provenant de l'hydrolyse de parois ou

de glycoprotéines végétales ou fongiques peuvent agir comme phytohormones ou comme éliciteurs de réactions de défenses chez les plantes.

L'intérêt industriel du procédé selon l'invention est évident car il permet pour la première fois d'atteindre une production de l'ordre du kilogramme d'oligosaccharides complexes d'intérêt biologique. Tous les oligosaccharides d'intérêt biologique dont nous envisageons la synthèse à l'échelle industrielle ne sont actuellement disponibles qu'à l'échelle du mg et à des coût extrêmement élevés (jusqu'à 1 million de franc le gramme) ; le prix de revient de ces composés produits par la présente voie microbiologique sont infiniment moindre.

Des caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples et des figures suivantes dont les légendes sont représentées ci-après.

FIGURES

Figure 1 : Principe du procédé de production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc)

Le lactose(β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc) est transporté dans la cellule par la lactose perméase (Lac perméase). Le lactose ne peut pas être hydrolysé dans la cellule car la souche est un mutant LacZ⁻. L'expression du gène *lgtA* permet la production de l'enzyme LgtA qui transfère un GlcNac de l'UDP-GlcNac sur une molécule de lactose. Le trisacharide formé (β -D-GlcNac-[1-3]- β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc) est excrété dans le milieu.

Figure 2 : Culture à haute densité cellulaire de la souche JM109 témoin et de la souche JM109 (pCWlgtA) possédant le gène de la glycosyle transférase LgtA.

Le lactose est ajouté en continu et le lactose résiduel est déterminé enzymatiquement. La concentration de GlcNAc hydrolysable dans le milieu de culture est mesurée colorimétriquement après hydrolyse acide. Le lactose ajouté représente la quantité totale cumulée de lactose qui a été ajouté en continu.

Figure 3 : Spectre de masse en mode FAB⁺ du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β-D-GlcNAc-[1→3]-β-D-Gal-[1→4]-D-Glc) purifiée du surnageant de culture de la souche JM109(lgtA).

On observe les deux ions quasi-moléculaires [M+H]⁺ et [M+Na]⁺ à m/z 546 et 568. On observe également un ion [M+H]⁺ à m/z 442 qui est dû à la présence de β-D-GlcNAc-[1-3]-IPTG. Ceci indique que l'IPTG (isopropyl β-D-thiogalactose) utilisé pour induire la Lac perméase et LgtA est également glycosylé.

Figure 4 : Spectre du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β-D-GlcNAc-[1→3]-β-D-Gal-[1→4]-D-Glc) en RMN du proton à 323°K.

Le signal à 1,4 ppm est dû aux protons du groupement isopropyl du dérivé glycosylé de l'IPTG.

Figure 5 : Spectre RMN ¹³C du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β-D-GlcNAc-[1→3]-β-D-Gal-[1→4]-D-Glc).

Figure 6: Principe du procédé de production du lacto-N-néotétraose (β-D-Gal-[1-4]-β-D-GlcNAc-[1-3]-β-D-Gal-[1-4]-β-D-Glc).

Le lactose (β-D-Gal-[1-4]-β-D-Glc) est transporté dans la cellule par la Lac perméase. Le lactose ne peut pas être hydrolysé dans la cellule car la souche est un mutant LacZ⁻. L'expression du gène *lgtA* permet la production de l'enzyme LgtA qui transfère un GlcNAc de l'UDP-GlcNAc sur une molécule de lactose. Le trisaccharide formé est ensuite utilisé comme précurseur par LgtB qui transfère une molécule

de galactose de l'UDP-Gal pour former le lacto-N-néo-tétraose (β -D-Gal-[1-4]- β -D-GlcNAc-[1-3]- β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc).

Figure 7 : Culture à haute densité cellulaire de la souche JM109 (pCWlgtA, pBBlgtB).

5 Culture en présence de lactose à forte (5 g.l⁻¹) et à faible concentration (1 g.l⁻¹).

Figure 8 : Séparation sur Biogel P4 des oligosaccharides produits par la souche JM109 (pCWlgtA, pBBlgtB) en présence de lactose à une concentration initiale de 5 g.l⁻¹ (A) ou de 1 g.l⁻¹ (B).

10 Les pics 1, 2, 3, 4 correspondent respectivement aux lacto-N-néo-tétraose, lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose et lacto-N-néo-décaose.

EXEMPLES

Exemple 1 : Matériels et méthodes

15 1.1. Origine des plasmides et souches bactériennes

La souche JM109 d'*Escherichia coli* K12 (Yannisch-Perron *et al.* 1984) a été utilisée comme cellule hôte pour tous les exemples de production d'oligosaccharides décrits. La souche a été obtenue de la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) et son génotype est le
20 suivant : *F⁻ traD36 lacK^r Δ (lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14⁻(McrA⁻) Δ (lac-proAB) supE44 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 relA1.*

Les gènes *lgtA* et *lgtB* de *Neisseria meningitis* MC58 ont été fournis par Dr W. Wakarchuk (Institute for Biological Sciences, National Research council of Canada, 100 Sussex Drive, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada) sous la forme de deux plasmides pCW, l'un contenant le gène
25 *lgtA* (nommé ici pCWlgtA) et l'autre contenant le gène *lgtB* (nommé ici pCWlgtB). Les séquences de ces deux gènes sont disponibles dans la banque de données GenBank sous le n° U25839. Le plasmide pLimus28 a été acheté à la société New England Biolabs. Le plasmid pBBR1MCS

a été fourni par le Dr M. Kovach (Department of Microbiology and Immunology, Louisiana State University, Shreveport, LA 71130-3932, USA.)

5 1.2. Sous-clonages.

Les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook *et al.* (1989) ont été utilisées. Le fragment d'ADN de 0,835 kb contenant le gène *lgtB* a été obtenu par digestion du plasmide pCWlgtB par *Bam*H1 et *Hind*III. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur
10 pLitmus28 préalablement digéré par *Bam*H1 et *Hind*III pour former le plasmide pLitlgtB. Le fragment de 0,9 kb contenant le gène *lgtB* a été excisé du plasmid pLitlgtB par une digestion avec *Xho*I et *Hind*III et sous cloné dans le plasmide pBBR1MCS préalablement digéré par *Xho*I et *Hind*III pour former le plasmide pBBlgtB.

15

1.3. Conditions de culture

Les cultures de routine et la préparation des inocula furent réalisées sur le milieu LB (Sambrook *et al.* 1989). Les cultures à haute densité cellulaire ont été réalisées dans un fermenteur de 2 litres
20 contenant un volume initial de 1 litre de milieu ayant la composition suivante : glycérol (17.5 g.l⁻¹) ou glucose (15 g.l⁻¹), NH₄H₂PO₄ (7 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (7 g.l⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1 g.l⁻¹), thiamine.HCl (4.5 mg.l⁻¹), solution d'oligo-éléments (7.5 ml.l⁻¹), acide citrique (0.5 g.l⁻¹), KOH (2 g.l⁻¹). Le MgSO₄ est autoclavé séparément et la thiamine est stérilisée par
25 filtration. La solution d'oligo-éléments contient : nitrilotriacétate (70 mM, pH 6.5), citrate ferrique (7.5 g.l⁻¹), MnCl₂. 4H₂O (1.3 g.l⁻¹), CoCl₂ 6H₂O (0.21 g.l⁻¹), CuCl₂.2H₂O (0.13 g.l⁻¹), H₃BO₃ (0.25 g.l⁻¹), ZnSO₄. 7H₂O (1.2 g.l⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.15 g.l⁻¹). Les antibiotiques, ampicilline (50 mg.l⁻¹) et chloramphénicol (25 mg.l⁻¹) sont ajoutés pour

s'assurer de la présence des différents plasmides. La solution d'alimentation contient du glycérol (500 g.l⁻¹) ou du glucose (400 g.l⁻¹), du MgSO₄.7H₂O (12 g.l⁻¹) et de la solution d'oligo-éléments (25 ml.l⁻¹).

Les cultures à haute densité cellulaire sont inoculées à 2%.
5 Durant tout la culture, le taux d'oxygène dissous est maintenu à 20% de saturation en réglant manuellement le débit d'air et en ajustant automatiquement la vitesse d'agitation. Le pH est régulé automatiquement à 6,8 par l'addition d'ammoniaque aqueux (15% p/v). La température est maintenue à 34°C pour la souche
10 JM109(pCWlgtA) et à 28°C pour la souche JM109(pCWlgtA, pBBlgtB). La stratégie de culture à haute densité comprend généralement 3 phases : une première phase de croissance exponentielle qui est assurée par le substrat carboné (glycérol ou glucose) initialement présent dans le milieu ; une deuxième phase qui débute lorsque la
15 croissance devient limitée par la source de carbone qui est alors ajoutée en continu à un taux de 4,5 g.h⁻¹.l⁻¹ de glycérol ou 3,6 g.h⁻¹.l⁻¹ de glucose. Dans une troisième phase, ce taux est réduit de 60 % pour ralentir la croissance de manière à augmenter la teneur en oligosaccharides.

20 1.4. Dosage des oligosaccharides

Les échantillons (1 ml) sont prélevés durant la culture et immédiatement centrifugés dans des microtubes. Le surnageant est conservé pour le dosage des oligosaccharides extracellulaires. Le culot bactérien est resuspendu dans 1 ml d'eau puis est incubé dans un
25 bain-marie à 100°C pendant 30 min pour faire éclater les cellules. Après une seconde centrifugation le surnageant est conservé pour le dosage des oligosaccharides intracellulaires.

La concentration de lactose est mesurée en utilisant un kit de détermination enzymatique (Roche diagnostic). Les résidus *N*-acétyl-
30 glucosamine présents dans les oligosaccharides sont libérés par

hydrolyse acide comme précédemment décrit (Samain *et al.*, 1997) et ensuite quantifiés colorimétriquement par la méthode de Reissig *et al.*, (1955); dans la description, on entend par GlcNAc hydrolysable, la quantité de GlcNAc dosée de cette manière.

5

1.5. Purification des oligosaccharides

A la fin de la culture, les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation. Le surnageant est conservé pour la purification des oligosaccharides extracellulaires. Les cellules bactériennes sont
10 resuspendues dans 1 litre d'eau, puis sont perméabilisées par un traitement thermique (30 min à 100°C) pour libérer les oligosaccharides intracellulaires. Après une deuxième centrifugation ces oligosaccharides sont récupérés dans le surnageant.

Le premier et le deuxième surnageant contenant respectivement
15 les oligosaccharides extra- et intracellulaires sont adsorbés sur charbon actif (100 g par litre de surnageant). Après rinçage à l'eau distillée, les oligosaccharides sont élués avec de l'éthanol à 50% (v/v), concentrés par évaporation et lyophilisés.

Les oligosaccharides sont séparés par chromatographie
20 d'exclusion stérique sur une colonne (4.5 cm x 95 cm) de Biogel P4 permettant l'injection d'environ 300 mg de mélange d'oligosaccharides. L'élution est réalisée avec de l'eau distillée avec un débit de 40 ml.h⁻¹.

1.6. Préparation des allyl β -D-glucosides

25 L'allyl β -D-galactopyranoside et l'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide ont été synthétisés suivant le protocole décrit par Lee et Lee (1974)

1.7. Identification et caractérisation structurale des oligosaccharides

Les spectres de masse ont été réalisés avec un spectromètre de
30 masse (Nermag R-1010C). Pour chaque expérience le volume initial de matrice est de 4 μ l. Les produits ont été analysés en mode FAB⁺.

Les spectres de RMN ont été obtenus avec un spectromètre Bruker AC300.

Exemple 2 : Production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc).

Le principe est illustré par la figure 1. Nous avons utilisé la souche JM 109 d'*Escherichia coli* K12 dans laquelle nous avons introduit le plasmide pCWlgtA gène *lgtA*. La souche JM109 est *lacZ⁻*, c'est à dire qu'elle est incapable d'hydrolyser le lactose. Par contre elle est *lacY⁺*, ce qui signifie qu'elle peut synthétiser la lactose perméase. Le gène *lgtA* code pour une β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase (LgtA) transférant une unité N-acétyl-glucosamine sur le galactose du lactose.

La souche JM109 (pCWlgtA) ainsi que la souche témoin JM109 ont été cultivées à haute densité cellulaire (Samain *et al.*, 1997) sur glycérol comme source de carbone et d'énergie. Après une première phase de croissance exponentielle assurée par le glycérol initialement présent dans le milieu (17,5 g/l), la croissance devient limitée par le glycérol qui est alors ajouté en continu à un taux de 4,5 g.h⁻¹.l⁻¹. Durant cette deuxième phase de la culture, on introduit en continu 90 mg.h⁻¹.l⁻¹ de lactose. On injecte également au début de cette phase de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) (0.5 mM) pour induire l'expression de la lactose perméase et de la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase. Comme décrit dans la figure 2, le lactose ajouté ne s'accumule pratiquement pas dans le milieu, indiquant que le lactose est bien internalisé par les cellules bactériennes. On observe avec la souche JM 109 (pCWlgtA) une accumulation importante dans le milieu de culture d'un composé contenant de la N-acétylglucosamine (GlcNAc hydrolysable). La quantité de GlcNAc hydrolysable (3,8 mmole/l) produite correspond presque stoechiométriquement à la quantité de

lactose consommé (3,5 mmole/l), suggérant que la totalité du lactose internalisé a été glycosylée par LgtA.

A la fin de la culture, les cellules sont éliminées par centrifugation et les oligosaccharides présents dans le surnageant sont purifiés par
 5 adsorption sur charbon actif et élution à l'éthanol. Les oligosaccharides présents sont ensuite séparés suivant leur poids moléculaire sur une colonne de Biogel P4. Un seul composé majoritaire est retrouvé. Les données de spectrométrie de masse et de RMN indique que ce composé est bien le trisaccharide (β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-Glc)
 10 formé par l'addition d'un résidu GlcNAc sur une molécule de lactose. Le spectre de masse en mode FAB⁺ montre en effet la présence d'un ion quasi-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 546 (figure 3). Le spectre RMN du ¹H confirme la structure trisaccharidique, la présence d'un groupement acétyl et la configuration β des deux liaisons O-glycosidiques (figure 4).
 15 Le spectre RMN du ¹³C précise également que la liaison entre la GlcNAc et le galactose est bien de type 1,3 (figure 5).

Exemple 3 : Production de lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine

20

Le principe est décrit sur la figure 6. La souche d'*E. coli* JM 109 a été cotransformée avec les deux plasmides pCWlgtA et pBBlgtB portant respectivement les gènes *lgtA* (utilisé précédemment) et *lgtB* (codant pour une β -1,4-Galactosyl-transférase appelé LgtB). La souche JM109
 25 (pCWlgtA,pBBlgtb) a été cultivée à haute densité cellulaire en utilisant le glucose comme substrat de croissance. Au début de la deuxième phase on ajoute du lactose à forte (5 g.l⁻¹) ou à faible concentration (1 g.l⁻¹) et de l'IPTG à 0.1 mM. Contrairement à ce qui avait été observé avec la souche JM109 (pCWlgtA), on ne détecte, lors de la culture de
 30 cette souche, qu'une faible libération de GlcNAc hydrolysable dans le milieu. En revanche, on retrouve de la GlcNAc hydrolysable en quantité

importante dans la bactérie (figure 7). Lorsque l'apport de lactose est de 1 g.l⁻¹, on observe une internalisation complète du lactose (2,9 mmole.l⁻¹) et une production totale de GlcNAc lié de 1,45 g.l⁻¹ (6,5 mmole.l⁻¹) soit l'incorporation de plus de deux molécules de GlcNAc par molécule de lactose acceptrice. Quand le lactose est ajouté à forte concentration, l'internalisation est incomplète (3 g.l⁻¹ soit 8.7 mmole.l⁻¹) avec une production de GlcNAc également d'environ 6,5 mmole.l⁻¹. Dans ce cas le rapport molaire GlcNAc / lactose est proche de 1, ce qui est cohérent avec la synthèse de lacto-*N*-néo-tétraose.

La purification de la fraction oligosaccharidique intracellulaire a permis d'obtenir plusieurs composés principaux qui sont bien séparés par chromatographie sur Biogel P4. Les données de spectrométrie de masse et de RMN indiquent que ces composés correspondent aux structures suivantes : lacto-*N*-néo-tétraose [M+H]⁺ = 708 ; lacto-*N*-néo-hexaose [M+H]⁺ = 708 ; lacto-*N*-néo-octaose, [M+Na]⁺ = 1460 et probablement lacto-*N*-néo-décaose. Les proportions respectives de ces différents composés dépendent de la quantité de lactose ajoutée. Ainsi avec 5 g.l⁻¹ de lactose le produit majoritaire est le lacto-*N*-néo-tetraose (figure 8A). Par contre un apport de lactose plus faible (1 g.l⁻¹) favorise la formation de composés de plus haut degré de polymérisation, le lacto-*N*-néo-octaose devenant majoritaire (figure 8B).

La formation de polylactosamines homologues supérieurs du lacto-*N*-néo-tétraose s'explique par le fait que LgtA est capable d'utiliser le lacto-*N*-néo-tétraose pour former un pentasaccharide intermédiaire qui est glycosylé par LgtB pour donner du lacto-*N*-néo-hexaose. Ce dernier est lui même précurseur pour un nouveau cycle de glycosylation aboutissant à la formation de lacto-*N*-néo-octaose et ainsi de suite jusqu'au lacto-*N*-néo-décaose.

On n'observe pas la formation significative d'oligosaccharides à nombre de résidus impair et portant un galactose en position terminale non réductrice. Ceci indique que l'élongation des molécules est limitée

par l'incorporation du GlcNAc par LgtA et non pas par la galactosylation catalysée par LgtB.

Exemple 4 : Production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl)

La souche JM109(pCW1gtA) a été cultivée à haute densité cellulaire sur glycérol. Au début de la deuxième phase de culture, on ajoute 0,75 g.l⁻¹ d'allyl- β -D-galactopyranoside et 0,1 mM d'IPTG. On observe une internalisation totale de l'allyl- β -D-galactopyranoside au bout de 9 h avec une apparition stoechiométrique de GlcNAc hydrolysable dans le milieu extracellulaire. Les oligosaccharides présents dans le milieu extracellulaire sont purifiés comme dans l'exemple 2. Le spectre de masse en mode FAB⁺ du produit majoritaire obtenu montre la présence d'un ion quasi-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 424 correspondant à la structure β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-A \rightarrow O-allyl.

Exemple 5 : Production du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNAc-1 \rightarrow O-allyl

La souche JM109 (pBB1gtB) a été cultivée à haute densité cellulaire sur glycérol. Au début de la deuxième phase de culture, on ajoute 0,5 g.l⁻¹ d'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (β -D-GlcNAc-1 \rightarrow Oallyl). On observe pendant les 5 premières heures une diminution d'environ 30% de la quantité de GlcNAc hydrolysable extracellulaire, ce qui démontre une internalisation partielle d'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide. Parallèlement on observe une production intracellulaire presque stoechiométrique de GlcNAc hydrolysable et de résidus galactose liés en β (hydrolysables par la β -galactosidase). Ces résultats

démontrent que 30% de l'allyl-*N*-acétyl- β -D-glucosaminide initialement ajouté a été galactosylé par l'activité encodée par le gène *lgtB*. Après purification, la structure du composé attendu (β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-1->O-allyl) a été confirmée par spectrométrie de masse et RMN.

5

Exemple 6 : Production d'analogues du lacto-*N*-néo-tétraose et de polylectosamines dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl

La souche JM109 (pCWlgtA et pBBlgtB) a été cultivée
10 comme dans l'exemple 3 sauf que l'apport de lactose a été remplacé par l'addition de 0,65 g.l⁻¹ d'allyl- β -D-galactopyranoside. Après purification selon le protocole de l'exemple 3, on obtient 3 composés principaux. Les données de spectrométrie de masse indiquent que ces trois composés correspondent aux tri-, penta- et hepta-saccharides suivants :

- 15 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 586;
 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 951;
 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 1316;

20

REFERENCES

1. Boons (1996) *Tetrahedron* **52**, 1095-1121.
- 5 2. Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D., Van Montagu M., Holsters M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2669-2673.
3. Gilbert M., Cunningham A.M., Watson D.C., Martin, A., Richards, J.C., Wakarchuk, W.W. (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**, 187-194.
- 10 4. Kamst E., van der Drift K.M.G., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1995) *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **177**, 6282-6285.
- 15 5. Kovach, M.E., Elzre, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Rarris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, K.M., (1995). *Gene* **166**, 175-176.
6. Lee R.T., Lee Y.C. (1974). *Carbohydr. Res.* **37**, 193-203.
- 20 7. Martin, S.L., Edbrooke, M.R., Hodgman, T.C., van den Eijnden, D.H, Bird, M.I., (1997) *J. Biol. Chem.*, **34**, 21349-21356
8. Mergaert P., D'Haese W., Geelen D., Promé D. Van Montagu M., Geremia R., Promé J.C., Holsters M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29217-29223.
- 25 9. Reissig, J.L., Strominger, J. L., Leloir, L.F., (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.

10. Roy R (1997) Recent developements in the rational design of multivalent glycoconjugates, in Topics curr chem., (eds J.Thiem and H. Driguez), Springer, Heidelberg, pp 241-274.
- 5 11. Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Drigucz, H., Gcemia, R.A. (1997). *Carbohydr. Res.* **30**, 235-242.
12. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press. N.Y.
- 10 13. Spaink H.P., Wijfjes A.H.M., van der Drift K.M.G., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. (1994) *Mol. Microbiol.* **13**, 821-831.
- 15 14. Yannisch-Perron C., Viera J., Messing J. (1985). *Gene*, **33**, 103-119.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'un oligosaccharide d'intérêt par une
5 cellule à partir d'au moins un précurseur exogène, ledit précurseur
intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit
procédé comprenant les étapes de :

i) Obtention d'une cellule qui :

- comprend au moins un gène codant pour un enzyme capable
10 d'effectuer une modification dudit précurseur exogène ou de l'un des
intermédiaires de la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide à
partir dudit précurseur exogène, nécessaire à la synthèse dudit
oligosaccharide à partir dudit précurseur, ainsi que les éléments
permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule,
- 15 • est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit
oligosaccharide, ledit précurseur et lesdits intermédiaires ;

ii) Mise en culture de ladite cellule en présence d'au moins undit
précurseur exogène, dans des conditions permettant
l'internalisation dudit précurseur exogène par ladite cellule et
20 la production dudit oligosaccharide par ladite cellule.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite
cellule comprend en outre au moins un gène codant pour un enzyme
capable d'effectuer une modification d'un précurseur endogène
intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit
25 enzyme étant identique ou différent de l'enzyme selon la revendication
1, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite
cellule et caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité
enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur.

3. Procédé selon les revendications 1 et 2 caractérisé en ce que
30 ladite cellule est une cellule choisie parmi les bactéries et les levures.

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la cellule est une bactérie, de préférence de type *Escherichia coli*.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que ladite modification est choisie parmi la glycosylation, la sulfatation, l'acétylation, la phosphorylation, la succinylation, la
5 méthylation, l'addition d'un groupement énoypyruvate.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que ledit enzyme est un enzyme capable d'effectuer une glycosylation choisi parmi les glycosyl-transférases.

10 7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que ledit enzyme est une glycosyl-transférase choisie parmi la β -1,3-N-acétyl-glucosaminy-l-transférase, la β -1,4-galactosyl-transférase, l' α -1,3-galactosyl transférase l' α -1,4-galactosyl-transférase, l' α -2,3-sialyl-transférase, l' α -1,3-fucosyl-transférase.

15 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que ladite mise en culture cellulaire est effectuée sur un substrat carboné.

9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que ledit substrat carboné est choisi parmi le glycérol et le glucose.

20 10. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9 caractérisé en ce que ladite mise en culture est effectuée dans des conditions permettant l'obtention d'une culture à haute densité cellulaire.

11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que ladite étape de mise en culture comprend :

- 25 a)- une première phase de croissance cellulaire exponentielle assurée par ledit substrat carboné;
- b)- une seconde phase de croissance cellulaire limitée par ledit substrat carboné qui est ajouté de manière continue ;
- c)- une troisième phase de croissance cellulaire ralentie obtenue
30 en ajoutant de manière continue dans la culture une quantité dudit substrat diminuée par rapport à la quantité de substrat

ajoutée à l'étape b) de façon à augmenter la teneur en oligosaccharides produits dans la culture à haute densité cellulaire.

5 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que la quantité de substrat ajouté de manière continue dans la culture cellulaire au cours de ladite phase c) est diminuée d'au moins 30%, de préférence 50%, de manière préférée 60% par rapport à la quantité de substrat ajouté de manière continue lors de ladite phase b).

10 13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12 caractérisé en ce que ledit précurseur est ajouté lors de la phase b).

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que ledit précurseur est de nature glucidique, de préférence de nature oligosaccharidique.

15 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que ledit précurseur est internalisé selon un mécanisme de transport passif.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que ledit précurseur est un monosaccharide dont le carbone anomère est lié à un groupement alkyl.

20 17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que ledit groupement alkyl est un allyl.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 17 pour la production du $[\beta\text{-D-Gal-[1}\rightarrow\text{4]}\text{-}\beta\text{-D-GlcNac-1}\rightarrow\text{O-allyl}]$ caractérisé en ce que :

- 25
- ladite cellule est une bactérie de génotype LacZ⁻ ;
 - ledit enzyme est la $\beta\text{-1,4-galactosyl-transférase}$;
 - ledit substrat est le glycérol ;
 - ledit précurseur est l'allyl-N-acétyl $\beta\text{-D-glucosaminide}$ ($\beta\text{-D-GlcNac-1}\rightarrow\text{O-allyl}$).

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que ledit précurseur est internalisé selon un mécanisme de transport actif.

20. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que ledit
5 précurseur est le lactose.

21. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que ledit précurseur est choisi dans le groupe composé :

- de β -galactosides naturels ou synthétiques, de préférence dans le 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose (lactulose), le 3-O- β -
10 D-galacto-pyranosyl-D-arabinose, l'allyl- β -D-galactopyranoside ;
- d' α -galactosides, de préférence le mélibiose, le raffinose ;
- de saccharose.

22. Procédé selon les revendications 20 et 21 caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose
15 perméase.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur.

24. Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que ladite
20 cellule a un génotype LacZ⁻.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'addition d'un inducteur dans ledit milieu de culture pour induire l'expression dans ladite cellule dudit enzyme et/ou d'une protéine impliquée dans ledit transport actif.

26. Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que ledit
25 inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ladite protéine est la lactose perméase.

27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 pour la production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-
30 [1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc) caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$;
- ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase ;
- ledit substrat est le glycérol ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- 5 • ledit précurseur est le lactose.

28. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 pour la production du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce que :

- 10 • ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$;
- lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase ;
- ledit substrat est le glucose ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- 15 • ledit précurseur est le lactose.

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 pour la production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl) caractérisé en ce que :

- 20 • ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$;
- ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase ;
- ledit substrat est le glycérol ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

25 30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 pour la production d'analogues du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamines dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype $LacZ^-$, $LacY^+$;

- lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase ;
- ledit substrat est le glucose ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- 5 • ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

31. Procédé selon les revendications 1 à 30 de production d'oligosaccharide marqué par au moins un isotope caractérisé en ce que ladite cellule est cultivée sur ledit substrat carboné marqué par ledit isotope et/ou en présence d'undit précurseur marqué par ledit isotope.

10 32. Oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 31.

33. Oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 18, 21, 29 et 30, caractérisé en ce que la double liaison du groupement allyl dudit oligosaccharide
15 est modifiée chimiquement par les réactions d'addition, d'oxydation ou d'ozonolyse pour former des oligosaccharides activés utilisables pour la synthèse chimique de glycoconjugués ou de glycopolymères.

34. Oligosaccharide selon la revendication 32 ou 33 à titre de médicament.

20 35. Oligosaccharide selon la revendication 34 à titre de médicament destiné à empêcher sélectivement l'adhésion de molécules biologiques.

36. Oligosaccharide selon la revendication 34 à titre de médicament destiné au traitement du cancer, de l'inflammation, des
25 maladies cardiaques, du diabète, des infections bactériennes, des infections virales, des maladies neurologiques, des greffes.

37. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un oligosaccharide selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

38. Utilisation d'un oligosaccharide selon la revendication 32 ou 33 dans l'agriculture et l'agronomie notamment pour la croissance et la défense des végétaux.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIETE INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

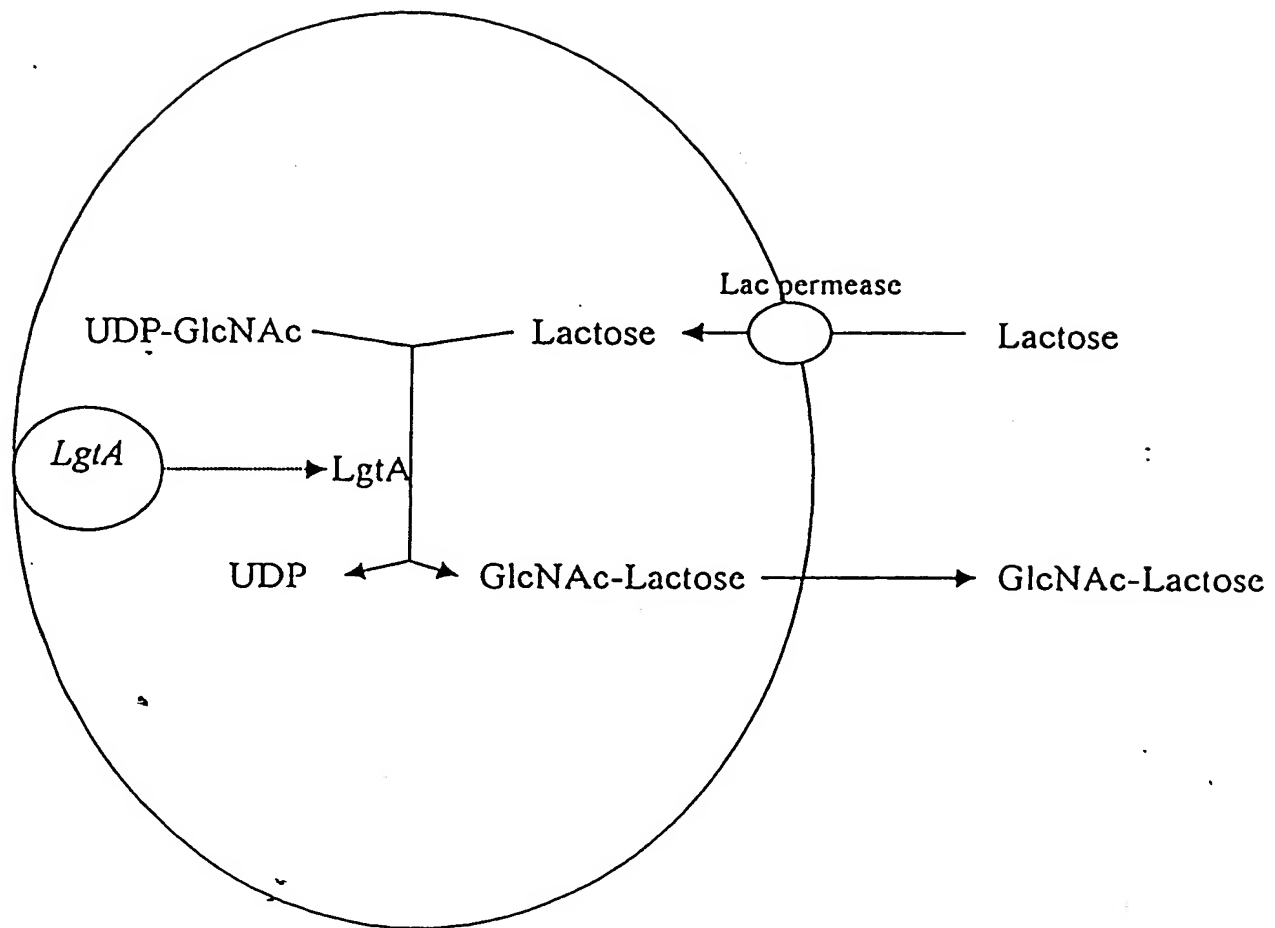


FIGURE 1

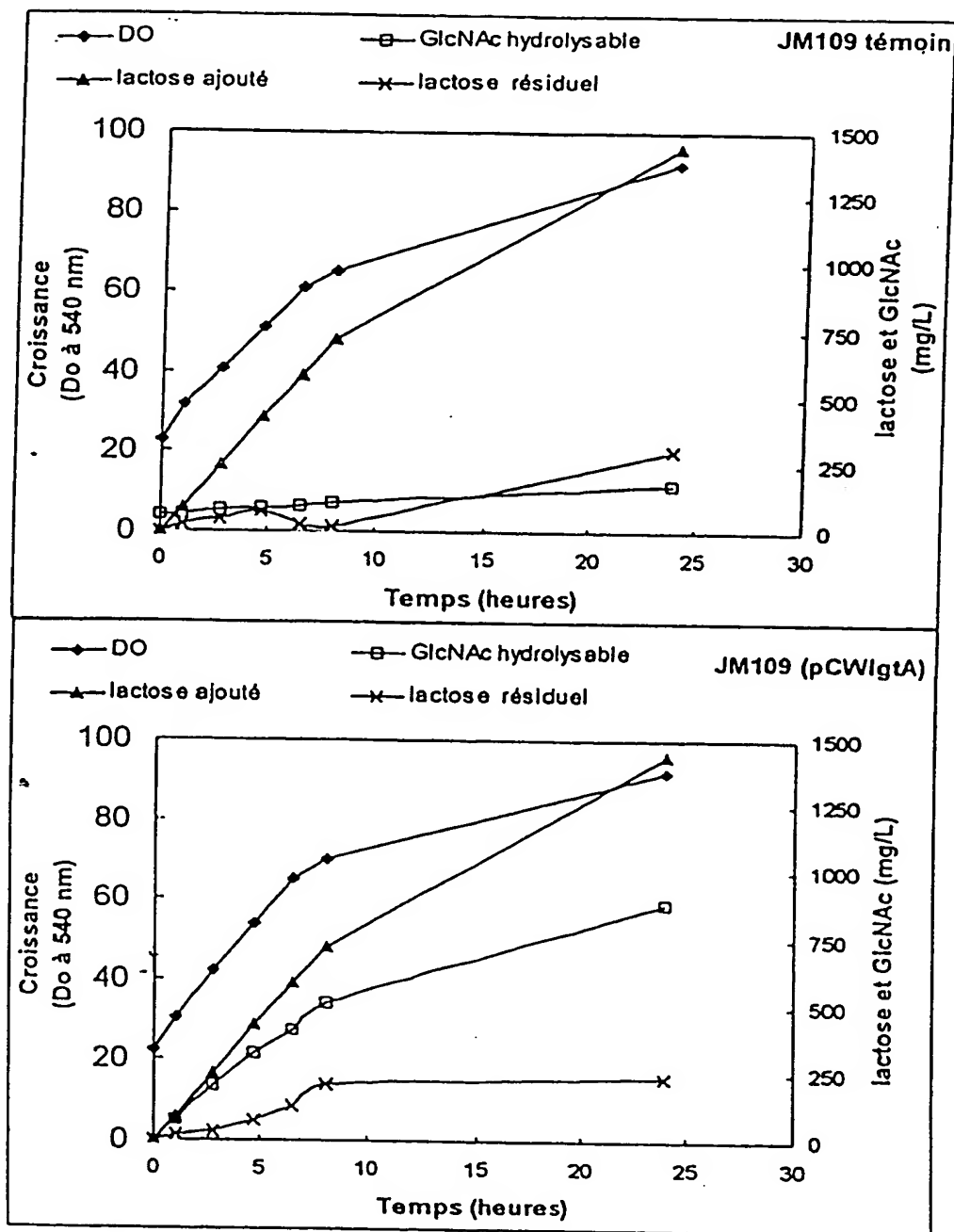


FIGURE 2

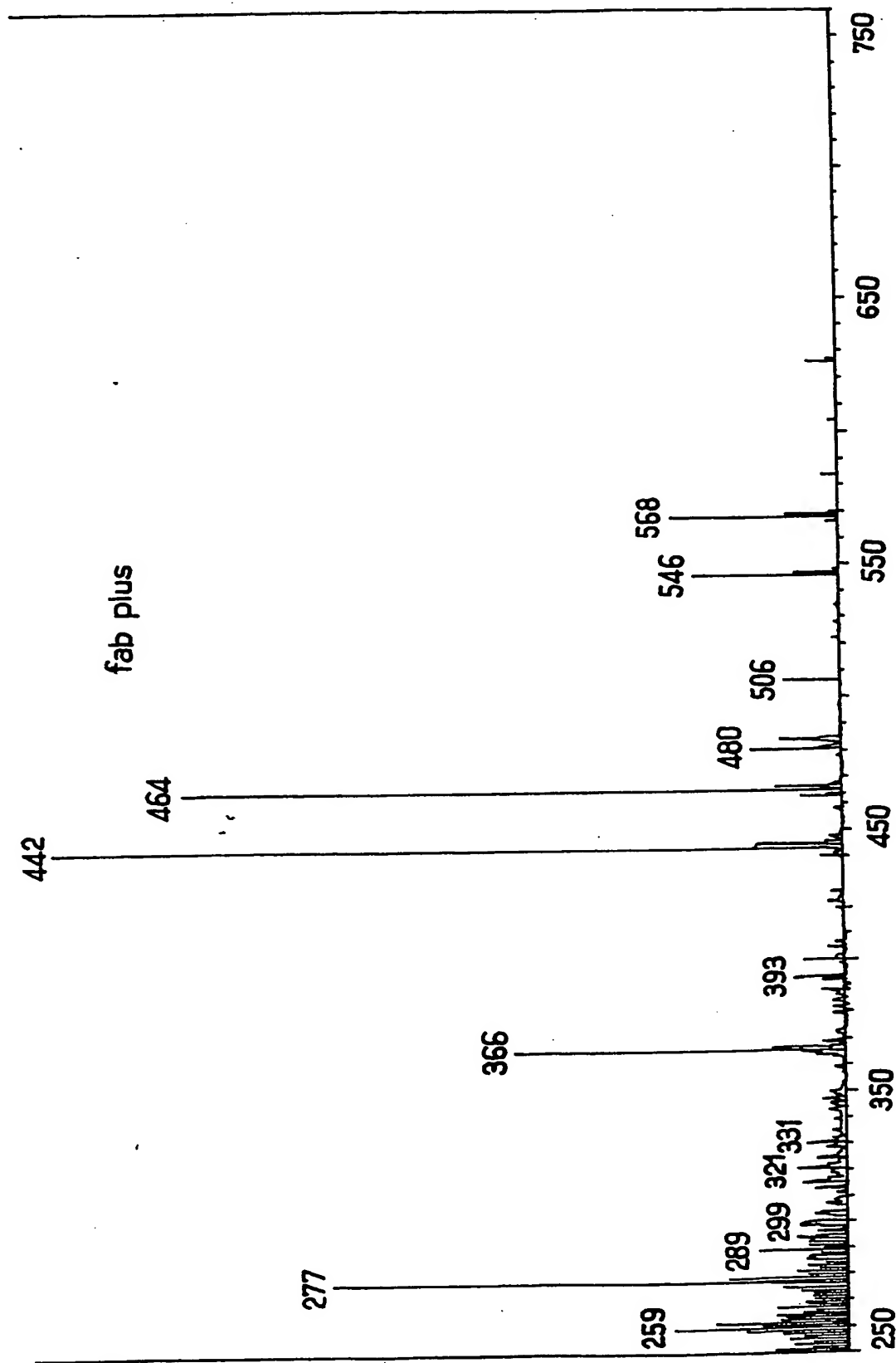
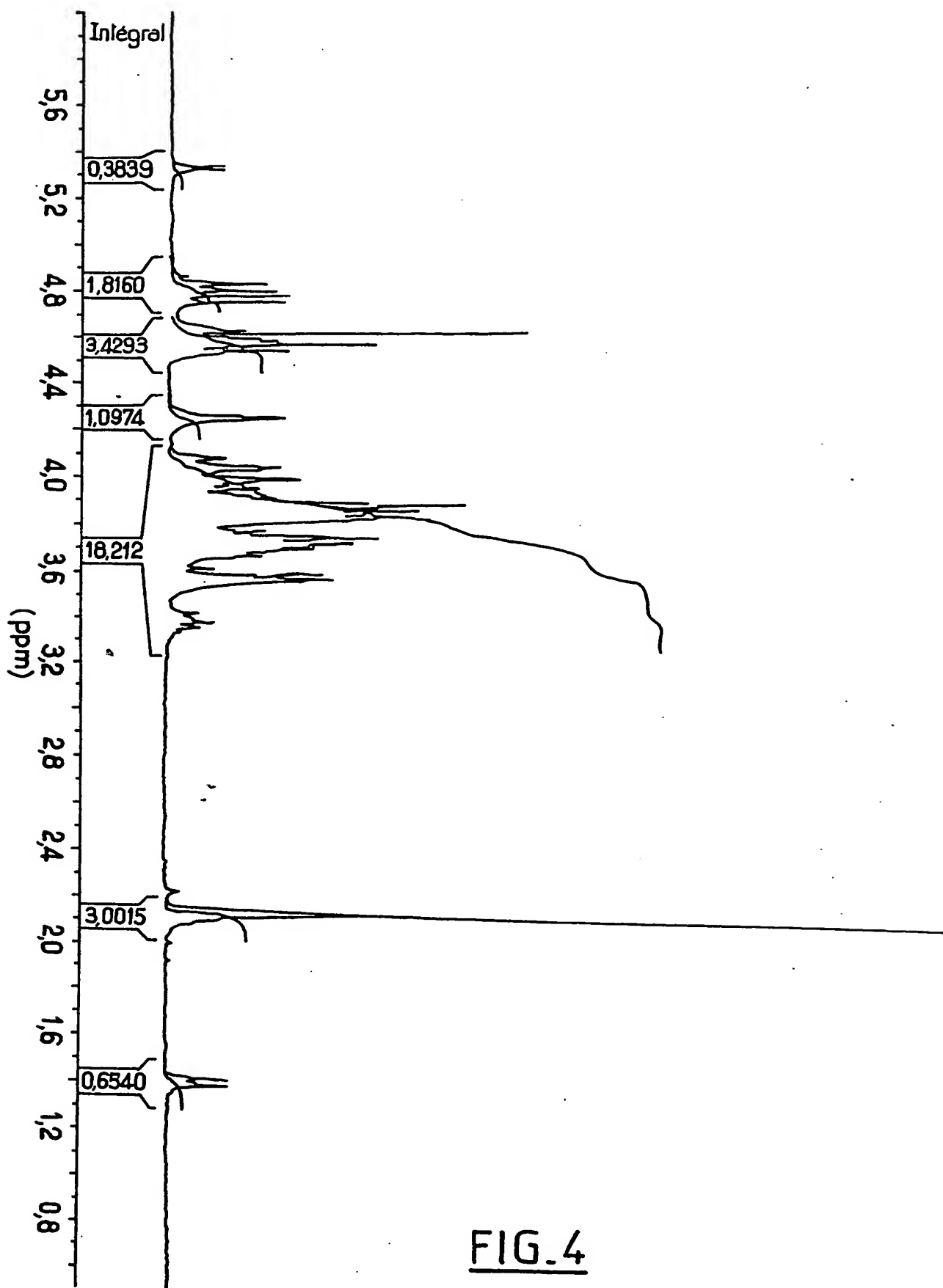


FIG-3

FIG.4

5 / 8

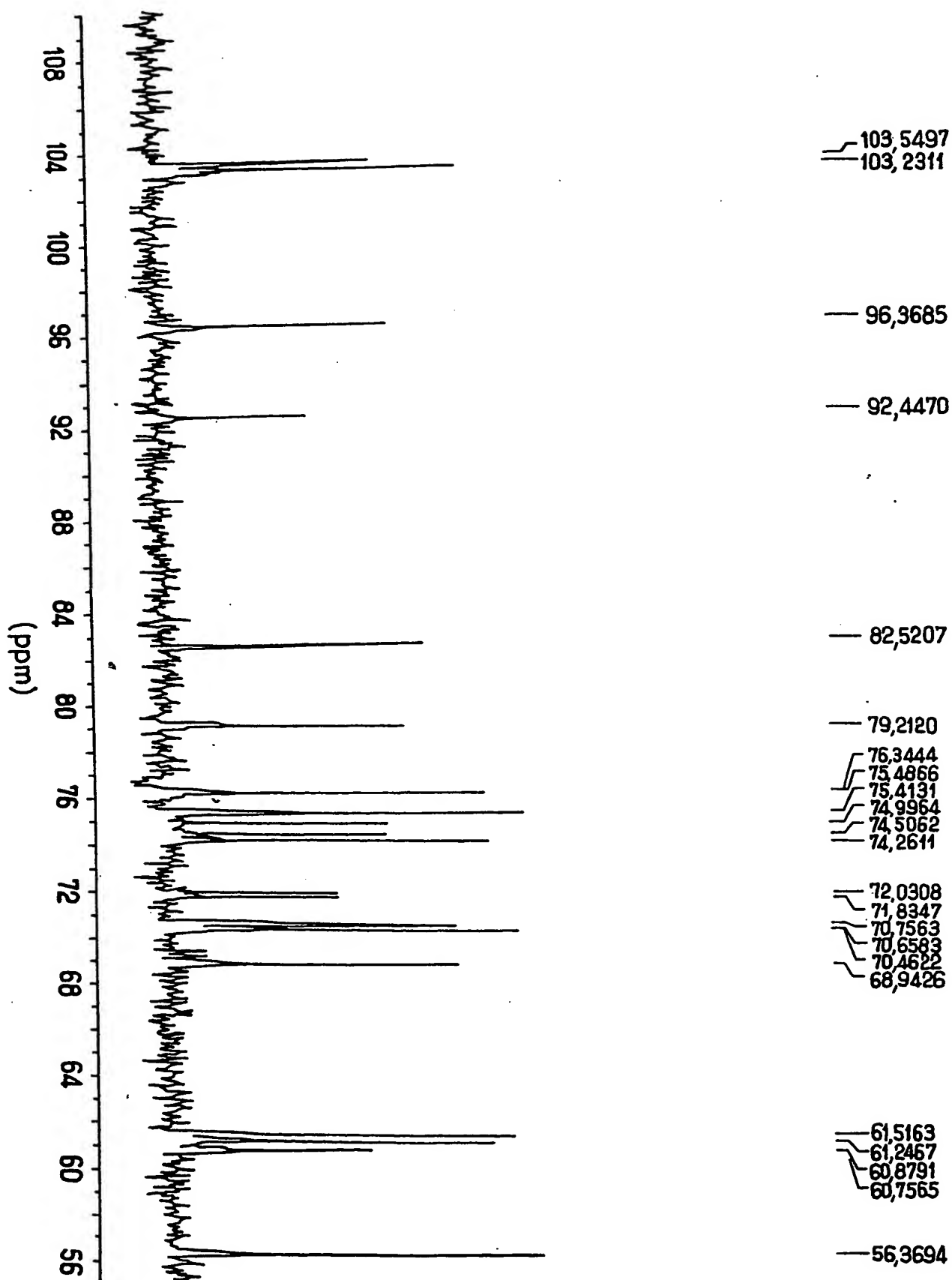


FIG.5

ORIGINAL

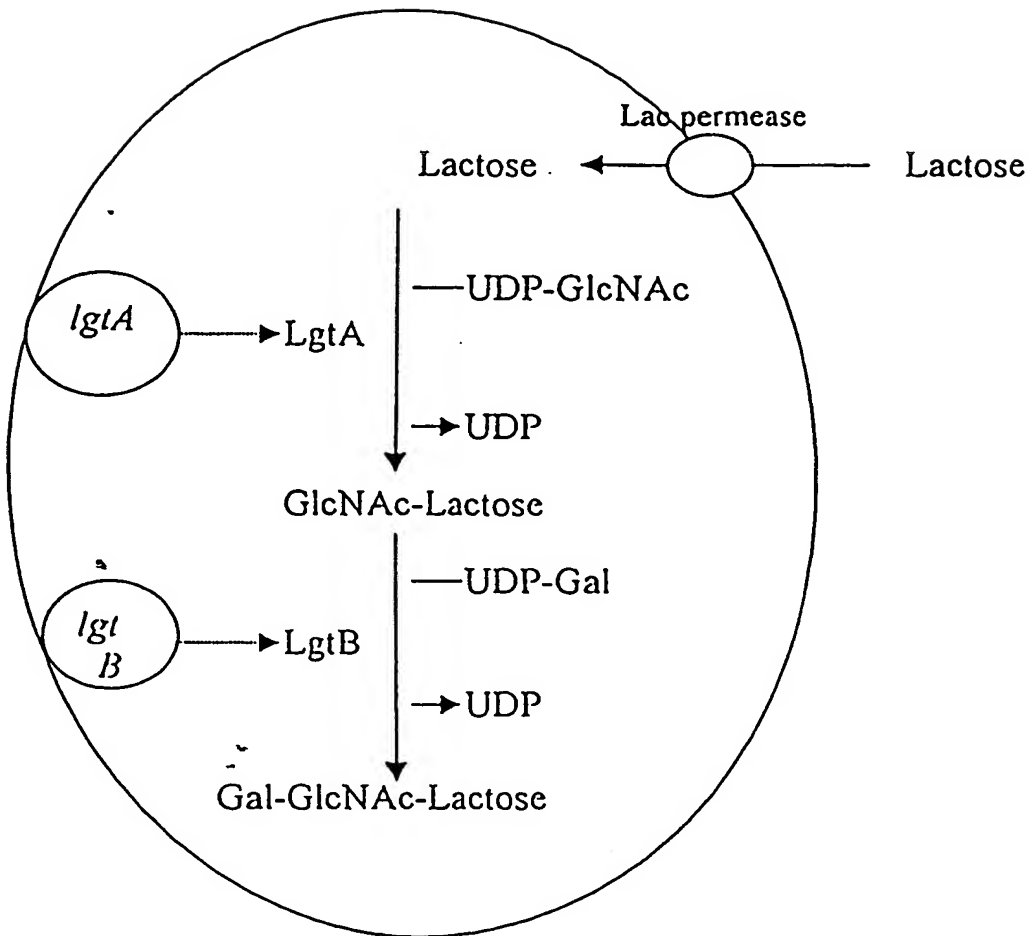


FIGURE 6

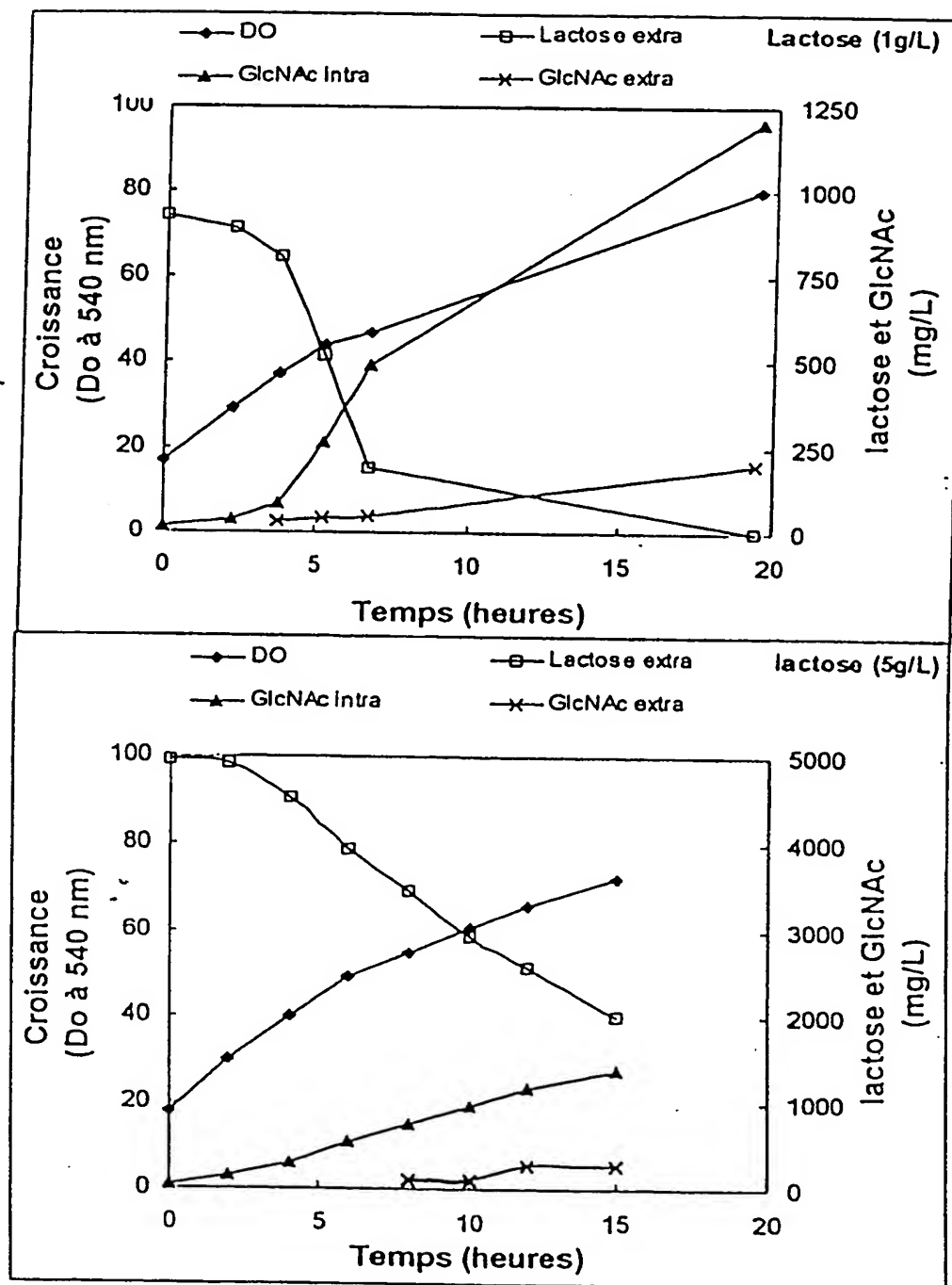
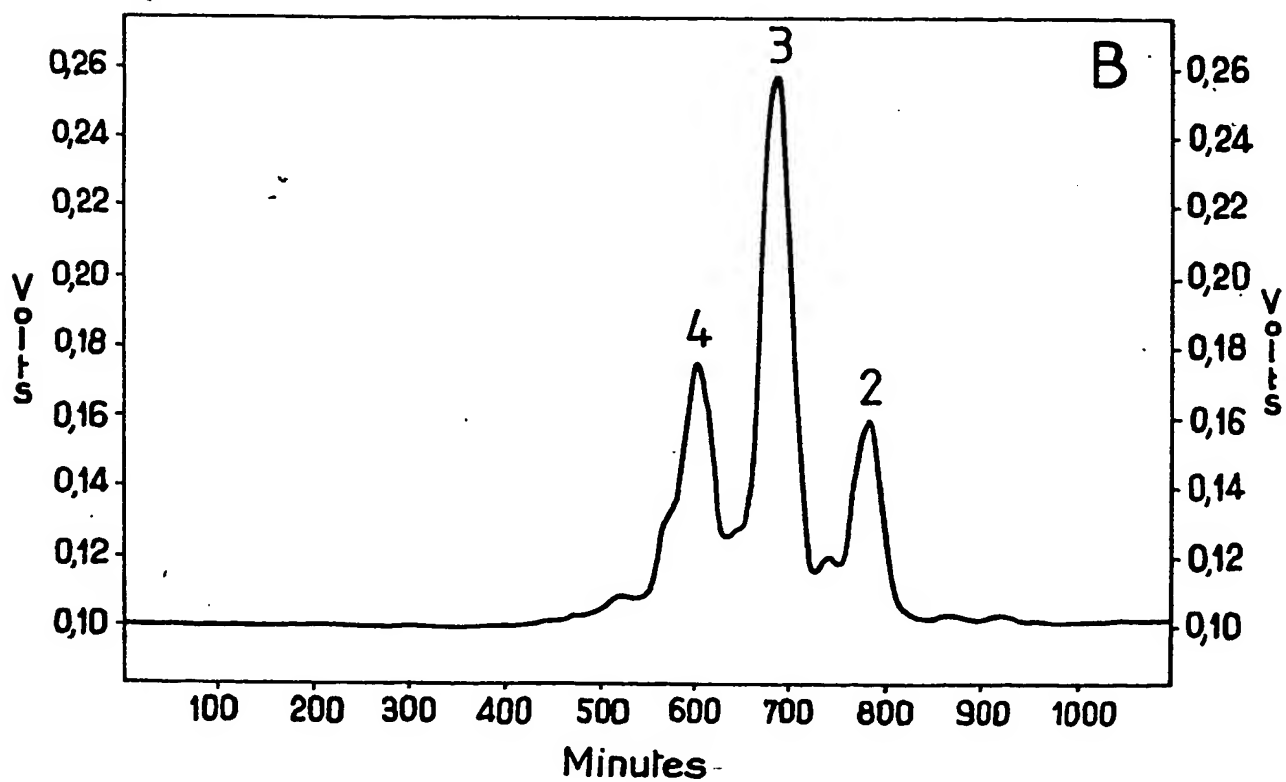
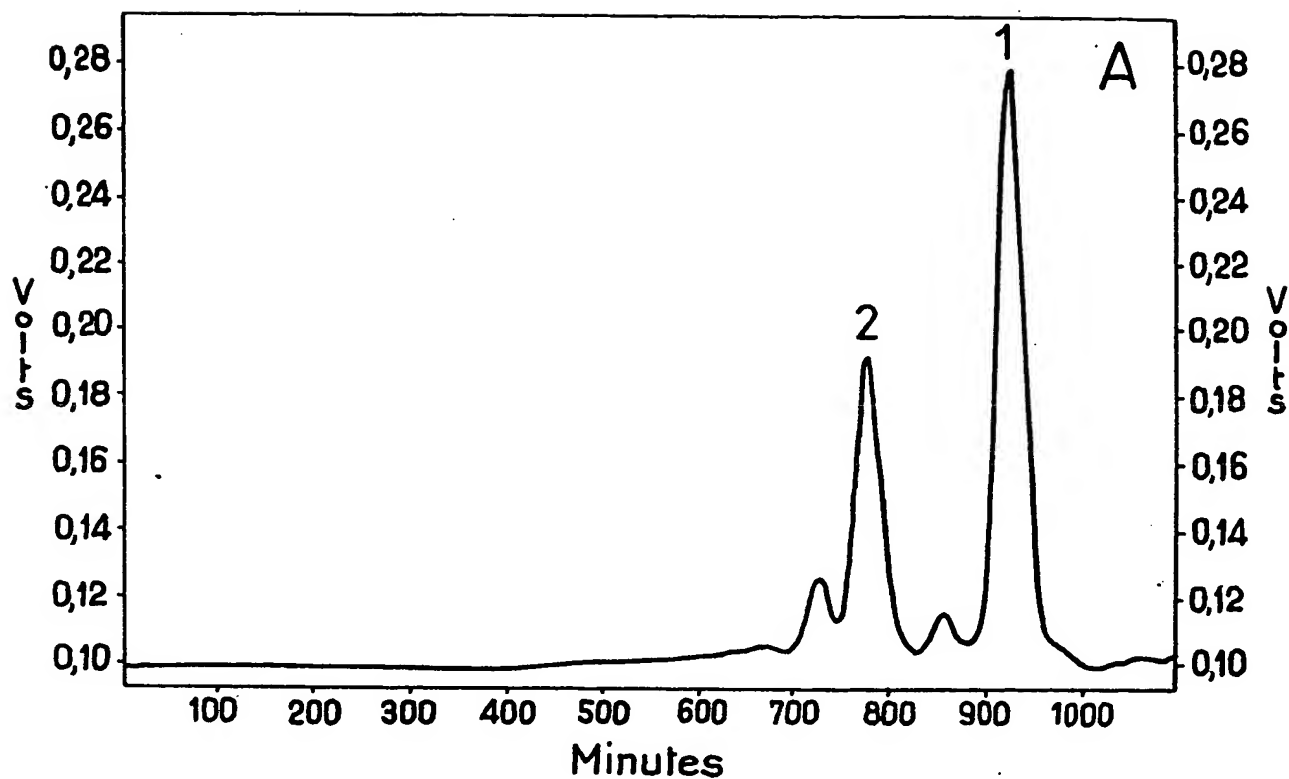


FIGURE 7

FIG. 8